Probl Cryobiol Cryomed 2019; 29(2):160
https://doi.org/10.15407/cryo29.02.160

Ефективність різних способів кріоконсервування меристем томату (*Lycopersicon esculentum Mill.*)

Н.О. Шевченко[2], Г.В. Мозговська[1], Т.М. Мірошниченко[1], Т.В. Івченко[1], Н.О. Баштан[1]
[1]*Інститут овочівництва і баштанництва НААН України, сел. Селекційне, Харківська область*
[2]*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків*

Effectiveness of Different Cryopreservation Methods of Tomato Meristems (*Lycopersicon esculentum Mill.*)

N.O. Shevchenko[2], H.V. Mozgovska[1], T.M. Miroshnichenko[1],
T.V. Ivchenko[1], N.O. Bashtan[1]
[1]*Institute of Vegetable and Melon Growing of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Selektsiine village, Kharkiv region, Ukraine*
[2]*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine*

Lycopersicon esculentum – одна з найбільш досліджених сільськогосподарських культур, яка використовується у якості модельної системи для генетичного, молекулярного та фізіологічного аналізу. Збереження *ex situ* колекції культурних видів томатів потребує розробки ефективних методів очищення колекційного матеріалу від вірусів. Насіння томатів відноситься до ортодоксального і може ефективно зберігатися за –20°С, однак є вірусні форми, які утворюють стерильні квітки та не розмножуються насінням. Мета роботи – розробка ефективних методів кріоконсервування меристем томатів для одержання безвірусної культури.

Оцінювали ефективність різних способів кріоконсервування меристем *in vitro* проростків *L. esculentum*. Кріоконсервували тритижневі проростки, у яких видаляли листя та розрізали на сегменти з 2–3 міжвузліллями. Сегменти витримували по 20 хв у розчинах ДМСО або 1,2-ПД (5%→10%→15%), потім поміщали у поліімідно-фторопластові контейнери і заморожували у парах азоту (–120°С) за експоненційним режимом [B.W.W. Grout, 1978]. Відігрівали у водяній бані за 40°С. Сегменти відмивали від кріопротекторів у середовищі MS, виділяли меристеми. Показник збереженості деконсервованих зразків склав 0%. Меристеми кріоконсервували після виділення з *in vitro* проростків. У одній серії експериментів експланти витримували протягом доби у середовищі MS з 0,5М сахарози, після поміщали на 60 хв у PVS2 та PVSN [Н.О. Шевченко, 2018]. Меристеми переносили у кріопробірки або на алюмінієві пластини (l,5 мм), які занурювали у рідкий азот. Кріопробірки відігрівали у водяній бані за 40°С, алюмінієві пластини – у живильному середовищі, яке містило 0,5М сахарози, за 25ºС. Показник збереженості зразків склав 0%. У іншій серії експериментів експланти 24 години витримували у рідкому середовищі MS із додаванням 0,4 М сахарози, після їх переносили на 20 хв у розчин 2 М гліцерину з 0,4 М сахарози, потім на 60 хв у PVS2 або модифікований PVS1 (22% гліцерину; 13% 1,2-ПД; 13% ЕГ; 6% ДМСО та 0,4 М сахарози). Меристеми кріоконсервували у металевих контейнерах для мікрокалориметра прямим зануренням у рідкий азот, відігрівали у середовищі MS (25°С). Показник збереженості в обох варіантах дослідження склав біля 75%.

Таким чином, двоетапна дегідратація меристем перед дією знижених температур та використання металевих контейнерів дозволяє отримати високі показники збереженості деконсервованих зразків і може використовуватися для подальших досліджень.

Tomato meristem *Lycopersicon esculentum Mill*. is one of the most studied crops, used as a model system for genetic, molecular and physiological analysis. *Ex situ* preservation of tomato cultivar collection requires the development of effective methods of viral elimination of collection material. Although tomato seeds can be effectively preserved at –20°C, there are viruses forming sterile flowers and do not propagate by seeds. The research aim was to develop effective cryopreservation methods of tomato meristems to derive virus-free cultures.

The effectiveness of different cryopreservation methods of tomato meristems *in vitro* sprouts was determined. Three-week sprouts in which the leaves were removed and cut into segments with 2–3 interstitials [Grout B.W.W., 1978] were cryopreserved. The segments were kept for 20 min in DMSO and 1,2-propanediol solutions (5% → 10% → 15%), after which they were placed into polyimide-fluoroplastic containers and frozen in nitrogen vapor (–120°C) under exponential regimen. They were thawed in a water bath at 40°C. The segments were washed from cryoprotectants in MS medium, hereafter meristems were isolated. The preservation rate of samples was 0%. Meristems were cryopreserved after isolation from *in vitro* sprouts. In one series of experiments, the explants were maintained in the nutrient medium MS containing 0.5M sucrose during 24 hrs, hereafter they were placed in PVS2 and PVSN for 60 min [N.O. Shevchenko, 2018]. Meristems were transferred to cryovials (1 ml) and to aluminum plates (1.5 mm), immersed into liquid nitrogen. Cryovials were warmed in a water bath at 40°C, an aluminum plate were done in the nutrient medium containing 0.5 M sucrose at 25°C. Meristems were washed in a nutritional medium with the addition of sucrose. Preservation rate of samples was 0%. In the second series of the experiments, the explants were kept for 24 hrs in MS medium supplemented with 0.4 M sucrose, after that they were transferred to 2 M glycerol solution with 0.4 M sucrose for 20 min, then for 60 min in PVS2 or modified with PVS1 (22% glycerol + 13% 1,2-propanediol + 13% ethyleneglycol + 6% DMSO + 0.4 M sucrose). Meristems were cryopreserved in metal containers for DSC by direct immersion into liquid nitrogen and thawed in MS medium. The preservation rate in both experiments was about 75%.

The obtained results testify to the fact that two-stage dehydration of meristems *L. esculentum* prior to the low temperatures effect and the using of metal containers allow to achieve high survival indices of frozen-thawed samples and will be used in further studies.